



## Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

**Aktenzeichen:** 199 59 582.8

**Anmeldetag:** 10. Dezember 1999

**Anmelder/Inhaber:** Bayer AG, Leverkusen/DE

**Bezeichnung:** Nukleinsäuren, die für neue Acetylcholinrezeptor- $\beta$ -Untereinheiten von Insekten kodieren

**IPC:** C 07 H, C 07 K, C 12 Q

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 21. September 2000  
Deutsches Patent- und Markenamt  
Der Präsident  
Im Auftrag

**Nukleinsäuren, die für neue Acetylcholinrezeptor- $\beta$ -Untereinheiten von Insekten kodieren**

5 Die Erfindung betrifft Nukleinsäuren, die für Acetylcholinrezeptor- $\beta$ -Untereinheiten von Insekten kodieren, sowie Polypeptide, welche die biologische Funktion solcher Acetylcholinrezeptor- $\beta$ -Untereinheiten ausüben, und insbesondere deren Verwendung zum Auffinden von Wirkstoffen für den Pflanzenschutz.

10 Nikotinische Acetylcholinrezeptoren sind ligandengesteuerte Ionenkanäle, die eine Rolle bei der Neurotransmission im Tierreich spielen. Die Bindung von Acetylcholin oder anderen Agonisten an den Rezeptor verursacht eine vorübergehende Öffnung des Kanals und gestattet den Durchstrom von Kationen. Man nimmt an, dass ein Rezeptor aus fünf Untereinheiten besteht, die sich um eine Pore gruppieren. Jede  
15 dieser Untereinheiten ist ein Protein, das aus einem extrazellulären N-terminalen Teil besteht, gefolgt von drei Transmembranregionen, einem intrazellulären Teil, sowie einer vierten Transmembranregion und einem kurzen extrazellulären C-terminalen Teil. Bestimmte Untereinheiten tragen auf ihrem extrazellulären Teil die Bindestelle für Liganden wie Acetylcholin. Zwei vicinale Cysteine sind Bestandteil dieser  
20 Bindestelle und daher gemeinsames Strukturmerkmal aller ligandenbindenden Untereinheiten, die auch als  $\alpha$ -Untereinheiten bezeichnet werden. Untereinheiten ohne dieses Strukturmerkmal werden je nach Lokalisation und Funktion des Rezeptors als  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ - oder  $\epsilon$ -Untereinheiten bezeichnet (Changeux et al. 1992).

25 Acetylcholinrezeptoren sind vor allem in Wirbeltieren gut untersucht. Anhand ihrer anatomischen Lokalisierung und ihrer funktionellen Eigenschaften (Leitungseigenschaften des Kanals, Desensibilisierung, Sensitivität gegenüber Agonisten und Antagonisten, sowie gegenüber Toxinen wie z.B.  $\alpha$ -Bungarotoxin) lassen sich hier drei Gruppen unterscheiden. Die Einteilung korreliert mit der molekularen Zusammensetzung der Rezeptoren. Es gibt heterooligomere Rezeptoren mit der Unter-  
30 einheitenzusammensetzung  $\alpha_2\beta\gamma\delta$ , die im Muskel vorkommen (Noda et al. 1982,

Claudio et al. 1983, Devillers-Thiery et al. 1983, Noda et al. 1983a, b), heterooligomere Rezeptoren, die Untereinheiten aus der Gruppe  $\alpha 2$  -  $\alpha 6$  und  $\beta 2$  -  $\beta 4$  enthalten, und die im Nervensystem vorkommen (Schoepfer et al. 1990, Heinemann et al. 1997), sowie homooligomere Rezeptoren, die Untereinheiten aus der Gruppe  $\alpha 7$  -  $\alpha 9$  enthalten, und die ebenfalls im Nervensystem vorkommen (Lindstrom et al. 1997, Elgoyhen et al. 1997). Diese Einteilung wird auch durch eine Betrachtung der Verwandtschaft der Gensequenzen der verschiedenen Untereinheiten gestützt. Typischerweise sind die Sequenzen funktionell homologer Untereinheiten verschiedener Spezies ähnlicher als Sequenzen von Untereinheiten aus verschiedenen Gruppen, aber der gleichen Spezies. Weiterhin sind die Gensequenzen aller bekannten Acetylcholinrezeptor-Untereinheiten nicht nur untereinander in gewissem Maße ähnlich, sondern auch mit denen einiger anderer ligandengesteuerter Ionenkanäle (z.B. den Serotoninrezeptoren vom Typ  $5HT_3$ , den GABA-gesteuerten Chloridkanälen, den Glycin-gesteuerten Chloridkanälen). Man geht daher davon aus, dass alle diese Rezeptoren von einem gemeinsamen Vorläufer abstammen und ordnet sie in eine Supergenfamilie ein (Ortells et al. 1995).

In Insekten ist Acetylcholin der wichtigste exzitatorische Neurotransmitter des zentralen Nervensystems. Dementsprechend lassen sich Acetylcholinrezeptoren an Präparaten zentraler Ganglien aus Insekten elektrophysiologisch nachweisen. Der Nachweis gelingt sowohl an post- als auch an präsynaptischen Nervenendigungen sowie an den Zellkörpern von Interneuronen, Motorneuronen und modulatorischen Neuronen (Breer et al. 1987, Buckingham et al. 1997). Unter den Rezeptoren gibt es solche, die durch  $\alpha$ -Bungarotoxin inhibiert werden, und solche, die insensitive sind (Schloß et al. 1988). Die Acetylcholinrezeptoren sind außerdem der molekulare Angriffspunkt wichtiger natürlicher (z.B. Nikotin) und synthetischer Insektizide (z.B. Chloronikotinyle).

Die Gensequenzen einer Anzahl von nikotinischen Acetylcholinrezeptoren der Insekten ist bereits bekannt. So sind für *Drosophila melanogaster* die Sequenzen fünf verschiedener Untereinheiten beschrieben (Bossy et al. 1988, Hermanns-Borgmeyer

et al. 1986, Sawruk et al. 1990a, 1990b, Schulz et al. 1998); für *Locusta migratoria* sind ebenfalls fünf (Hermsen et al. 1998), für *Schistocerca gregaria* eine (Marshall et al. 1990), für *Myzus persicae* sechs (Sgard et al. 1998, Huang et al. 1999), für *Manduca sexta* zwei (Eastham et al. 1997, Genbank AJ007397) und für *Heliothis virescens* sechs (DE 198 19 829, Genbank AF143846, AF143847, AJ000399, AF096878, AF096879) Sequenzen beschrieben. Zudem ist eine Reihe von partiellen Gensequenzen aus *Drosophila melanogaster* als sog. expressed sequence tags charakterisiert worden (Genbank AA540687, AA698155, AA697710, AA697326). Diese Sequenzen können in  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten klassifiziert werden, je nachdem, ob die zwei vicinalen Cysteine der Ligandenbindestelle vorhanden sind oder nicht. Während aber in Vertebraten insgesamt vier verschiedene  $\beta$ -Untereinheiten bekannt sind (Schoepfer et al. 1990, Heinemann et al. 1997), in *Caenorhabditis elegans* mindestens fünf (Bargmann und Kaplan 1998), ist in jeder der untersuchten Insektenpezies mit Ausnahme von *Drosophila melanogaster* jeweils nur eine  $\beta$ -Untereinheit identifiziert worden (Huang et al., 1999, Hermsen et al. 1998, Genbank AJ007397). Bei dieser weit verbreiteten Untereinheit handelt es sich um ein Homologes der Untereinheit, die bei *Drosophila melanogaster* als ARD bezeichnet wird (Schloß et al. 1988). Die andere  $\beta$ -Untereinheit von *Drosophila*, SBD (Sawruk et al. 1990b), ist in ihrer Sequenz den  $\alpha$ -Untereinheiten ähnlicher als der anderen  $\beta$ -Untereinheit, besitzt aber nicht die vicinalen Cysteine.

Die rekombinante Expression nikotinischer Rezeptoren aus Insekten hat sich als schwieriger erwiesen als die der analogen Rezeptoren aus Vertebraten oder *C. elegans*. So ist es bisher im allgemeinen nicht gelungen, nikotinische Rezeptoren, die nur aus Untereinheiten von Insekten bestehen, so zu exprimieren, dass ihre funktionalen Eigenschaften wie z.B. Empfindlichkeit denen natürlicher Rezeptoren gleichen (Amar et al. 1995, Hermsen et al. 1998, Sgard et al. 1998). Zumindest einige  $\alpha$ -Untereinheiten aus verschiedenen Insektenpezies tragen jedoch zu einem funktionellen Rezeptor bei, wenn statt einer Insekten- $\beta$ -Untereinheit eine  $\beta$ 2-Untereinheit des Huhns in *Xenopus*-Oocyten koexprimiert wird (Marshall et al. 1990, Schulz et al. 1998, Matsuda et al. 1998). Dies, und die Tatsache, dass im

wesentlichen nur eine  $\beta$ -Untereinheiten aus Insekten bekannt ist, lässt die Vermutung zu, dass weitere, bisher unbekannte  $\beta$ -Untereinheiten vorliegen.

5 Es ist von großer praktischer Bedeutung, beispielsweise für die Suche nach neuen Insektiziden, nikotinische Rezeptoren aus Insekten in eukaryotischen Zelllinien oder in Oocyten von *Xenopus laevis* funktionell auszuprägen.

10 Der vorliegenden Erfindung liegt somit insbesondere die Aufgabe zu Grunde, Nukleinsäuren zur Verfügung zu stellen, die für neue Acetylcholinrezeptor- $\beta$ -Untereinheiten von Insekten kodieren. Diese neuen Nukleinsäuren sollen die rekombinante Ausprägung von nikotinischen Acetylcholinrezeptoren ermöglichen, die ausschließlich aus Untereinheiten von Insekten bestehen.

15 Die Aufgabe wird gelöst durch die Bereitstellung einer Nukleinsäure umfassend eine Sequenz ausgewählt aus

- (a) der Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1
- 20 (b) zumindest 14 Basenpaare langen Teilsequenzen der unter (a) definierten Sequenz,
- (c) Sequenzen, welche an die unter (a) definierte Sequenz hybridisieren,
- (d) Sequenzen, welche eine zumindest 70 %ige Identität mit der Sequenz  
25 zwischen Position 43 und Position 1368 der unter (a) definierten Sequenz aufweisen,
- (e) Sequenzen, welche zu der unter (a) definierten Sequenz komplementär  
30 sind und

- (f) Sequenzen, welche aufgrund der Degeneriertheit des genetischen Codes für dieselbe Aminosäuresequenz kodieren wie die unter (a) bis (d) definierten Sequenzen.

5 Bei den erfindungsgemäßen Nukleinsäuren handelt es sich insbesondere um einzelsträngige oder doppelsträngige Desoxyribonukleinsäuren (DNA) oder Ribonukleinsäuren (RNA). Bevorzugte Ausführungsformen sind Fragmente genomischer DNA, die Introns enthalten können, und cDNAs.

10 Eine bevorzugte Ausführungsform der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren stellt die cDNA dar, welche die Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 1 besitzt.

Der Grad der Identität der Nukleinsäuresequenzen wird vorzugsweise bestimmt mit Hilfe des Programms GAP aus dem Programmpaket GCG, Version 10.0 unter  
15 Standardeinstellungen (Devereux et al. 1984).

Der Ausdruck "hybridisieren", wie er hierin verwendet wird, beschreibt den Vorgang, bei welchem ein einzelsträngiges Nukleinsäuremolekül mit einem komplementären Strang eine Basenpaarung eingeht. Auf diese Weise können ausgehend von der  
20 hierin offenbarten Sequenzinformation beispielsweise DNA-Fragmente aus anderen Insekten als *Drosophila melanogaster* isoliert werden, welche für Polypeptide mit der biologischen Funktion von Acetylcholinrezeptor- $\beta$ -Untereinheiten kodieren.

Bevorzugte Hybridisierungsbedingungen sind nachstehend angegeben:  
25

Hybridisierungslösung: 6X SSC / 0 % Formamid, bevorzugte Hybridisierungslösung:  
6X SSC / 25 % Formamid

Hybridisierungstemperatur: 34°C, bevorzugte Hybridisierungstemperatur: 42°C  
30

1. Waschschrift: 2X SSC bei 40°C,
2. Waschschrift: 2X SSC bei 45°C; bevorzugter 2. Waschschrift: 0,6X SSC bei 55°C; besonders bevorzugter 2. Waschschrift: 0,3X SSC bei 65°C.

5 Von der vorliegenden Erfindung sind Nukleinsäuren umfasst, die eine zumindest 70 %ige Identität, vorzugsweise eine zumindest 80 %ige Identität, besonders bevorzugt eine zumindest 90 %ige Identität, ganz besonders bevorzugt eine zumindest 95 %ige Identität, mit der Sequenz zwischen Position 43 und Position 1368 der Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1 vorzugsweise über eine Länge von wenigstens 100,  
10 besonders bevorzugt wenigstens 500 fortlaufenden Nukleotiden und ganz besonders bevorzugt über die Gesamtlänge aufweisen.

Gegenstand der Erfindung sind weiterhin Vektoren, die zumindest eine der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren enthalten. Als Vektoren können alle in molekularbiologischen  
15 Laboratorien verwendete Plasmide, Phasmide, Cosmide, YACs oder künstliche Chromosomen verwendet werden. Für die Expression der erfindungsgemäßen Nukleinsäure kann diese mit üblichen regulatorischen Sequenzen verknüpft werden. Die Auswahl solcher regulatorischen Sequenzen ist davon abhängig, ob zur Expression pro- oder eukaryotische Zellen bzw. zellfreie Systeme verwendet werden. Besonders  
20 bevorzugt als Expressionskontrollsequenz sind z.B. der frühe oder späte Promotor des SV40 oder des Adenovirus, des Cytomegalovirus, das lac-System, das trp-System, die Haupt-Operator- und Promotorregionen des Phagen lambda, die Kontrollregionen des fd-Hüllproteins, der Promotor der 3-Phosphoglyceratkinase, der Promotor der Sauren Phosphatase und der Promotor des  $\alpha$ -Mating-Faktors der Hefe, der  
25 immediate early Promoter aus Baculovirus, der Metallothionin Promoter aus *Drosophila melanogaster*.

Zur Expression der erfindungsgemäßen Nukleinsäure kann diese in geeignete Wirtszellen eingebracht werden. Als Wirtszellen eignen sich sowohl prokaryotische Zellen,  
30 vorzugsweise *E.coli*, als auch eukaryotische Zellen, vorzugsweise Säuger- oder Insektenzellen. Weitere Beispiele für geeignete einzellige Wirtszellen sind: *Pseudomonas*,

Bacillus, Streptomyces, Hefen, HEK-293, Schneider S2, SF9, CHO-, COS1-, COS7-, Zellen, Pflanzenzellen in Zellkultur sowie Amphibienzellen, insbesondere Oocyten.

5 Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind auch die Polypeptide, die von der erfindungsgemäßen Nukleinsäure kodiert werden.

10 Weiterhin sind Polypeptide Gegenstand der vorliegenden Erfindung, welche eine Aminosäuresequenz umfassen, die eine zumindest 40 %ige Identität, vorzugsweise eine zumindest 60 %ige Identität, besonders bevorzugt eine zumindest 80 %ige Identität, mit der Sequenz gemäß SEQ ID NO: 2 über eine Länge von wenigstens 20, vorzugsweise wenigstens 25, besonders bevorzugt wenigstens 30 fortlaufenden Aminosäuren und ganz besonders bevorzugt über die Gesamtlänge aufweisen.

15 Der Grad der Identität der Aminosäuresequenzen wird vorzugsweise bestimmt mit Hilfe des Programms GAP aus dem Programmpaket GCG, Version 10.0 unter Standardeinstellungen (Devereux et al. 1984).

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind weiterhin Acetylcholinrezeptoren, die die erfindungsgemäßen Polypeptide umfassen.

20 Der Ausdruck "Polypeptide", wie er hierin verwendet wird, bezieht sich sowohl auf kurze Aminosäureketten, die gewöhnlich als Peptide, Oligopeptide oder Oligomere bezeichnet werden, als auch auf längere Aminosäureketten, die gewöhnlich als Proteine bezeichnet werden. Er umfasst Aminosäureketten, die entweder durch natürliche Prozesse, wie posttranslationale Prozessierung, oder durch chemische Verfahren, die Stand der Technik sind, modifiziert sein können. Solche Modifikationen können an verschiedenen Stellen und mehrfach in einem Polypeptid vorkommen, wie beispielsweise an dem Peptid-Rückgrat, an der Aminosäure-Seitenkette, am Amino- und/oder am Carboxy-Terminus. Sie umfassen beispielsweise Acetylierungen, Acylierungen, ADP-Ribosylierungen, Amidierungen, kovalente Verknüpfungen mit  
25 30 Flavinen, Häm-Anteilen, Nukleotiden oder Nukleotid-Derivaten, Lipiden oder Lipid-



Derivaten oder Phosphatidylinositol, Cyclisierungen, Disulfidbrückenbildungen, Demethylierungen, Cystin-Bildungen, Formylierungen, gamma-Carboxylierungen, Glycosylierungen, Hydroxylierungen, Iodierungen, Methylierungen, Myristoylierungen, Oxidationen, proteolytische Prozessierungen, Phosphorylierungen, Selenoylierungen und tRNA-vermittelte Additionen von Aminosäuren.

Die erfindungsgemäßen Polypeptide können in der Form "reifer" Proteine oder als Teile größerer Proteine, z.B. als Fusionsproteine, vorliegen. Weiterhin können sie Sezernierungs- oder "Leader"-Sequenzen, Pro-Sequenzen, Sequenzen, die eine einfache Reinigung ermöglichen, wie mehrfache Histidin-Reste, oder zusätzliche stabilisierende Aminosäuren aufweisen.

Die erfindungsgemäßen Polypeptide müssen nicht vollständige Acetylcholinrezeptor- $\beta$ -Untereinheiten darstellen, sondern können auch nur Fragmente davon sein, solange sie zumindest noch die biologische Funktion der vollständigen Untereinheiten ausüben können.

Die erfindungsgemäßen Polypeptide müssen nicht von Acetylcholinrezeptor- $\beta$ -Untereinheiten aus *Drosophila melanogaster* ableitbar sein. Als erfindungsgemäß werden auch Polypeptide betrachtet, die Acetylcholinrezeptor- $\beta$ -Untereinheiten von anderen Insekten entsprechen oder Fragmente davon, die noch die biologische Funktion dieser Untereinheiten ausüben können.

Die erfindungsgemäßen Polypeptide können im Vergleich zu der entsprechenden Region natürlich vorkommender Acetylcholinrezeptor- $\beta$ -Untereinheiten Deletionen oder Aminosäuresubstitutionen aufweisen, solange sie zumindest noch die biologische Funktion der vollständigen Untereinheiten ausüben. Konservative Substitutionen sind bevorzugt. Solche konservativen Substitutionen umfassen Variationen, wobei eine Aminosäure durch eine andere Aminosäure aus der folgenden Gruppe ersetzt wird:

1. Kleine aliphatische, nicht-polare oder wenig polare Reste: Ala, Ser, Thr, Pro und Gly;
2. Polare, negativ geladene Reste und deren Amide: Asp, Asn, Glu und Gln;
3. Polare, positiv geladene Reste: His, Arg und Lys;
- 5 4. Große aliphatische, nicht-polare Reste: Met, Leu, Ile, Val und Cys; und
5. Aromatische Reste: Phe, Tyr und Trp.

Die folgende Liste zeigt bevorzugte konservative Substitutionen:

Ursprünglicher Rest	Substitution
Ala	Gly, Ser
Arg	Lys
Asn	Gln, His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Ala, Pro
His	Asn, Gln
Ile	Leu, Val
Leu	Ile, Val
Lys	Arg, Gln, Glu
Met	Leu, Tyr, Ile
Phe	Met, Leu, Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp, Phe
Val	Ile, Leu

Der Ausdruck "biologische Funktion einer Acetylcholinrezeptor- $\beta$ -Untereinheit", wie er hierin verwendet wird, bedeutet eine Beteiligung am Aufbau von funktionsfähigen Acetylcholinrezeptoren, d.h. die Fähigkeit, mit anderen Untereinheiten der Rezeptoren interagieren zu können.

5

Eine bevorzugte Ausführungsform der erfindungsgemäßen Polypeptide stellt eine Acetylcholinrezeptor- $\beta$ -Untereinheit von *Drosophila melanogaster* dar, welche die Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 2 besitzt.

10

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind weiterhin Verfahren zum Herstellen der erfindungsgemäßen Polypeptide. Zur Herstellung der Polypeptide, die von der erfindungsgemäßen Nukleinsäure kodiert werden, können Wirtszellen, die die erfindungsgemäße Nukleinsäure enthalten, unter geeigneten Bedingungen kultiviert werden. Die gewünschten Polypeptide können danach auf übliche Weise aus den Zellen oder dem Kulturmedium isoliert werden.

15

Ein schnelles Verfahren zum Isolieren der erfindungsgemäßen Polypeptide, die von Wirtszellen unter Verwendung einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure synthetisiert werden, beginnt mit der Expression eines Fusionsproteins, wobei der Fusionspartner auf einfache Weise affinitätsgereinigt werden kann. Der Fusionspartner kann beispielsweise Glutathion S-Transferase sein. Das Fusionsprotein kann dann an einer Glutathion-Affinitätssäule gereinigt werden. Der Fusionspartner kann durch partielle proteolytische Spaltung beispielsweise an Linkern zwischen dem Fusionspartner und dem zu reinigenden erfindungsgemäßen Polypeptid abgetrennt werden. Der Linker kann so gestaltet werden, dass er Ziel-Aminosäuren, wie Arginin- und Lysin-Reste einschließt, die Stellen für eine Spaltung durch Trypsin definieren. Um solche Linker zu erzeugen, können Standard-Klonierungsverfahren unter Verwendung von Oligonukleotiden angewendet werden.

20

25

30

Weitere mögliche Reinigungsverfahren basieren auf präparativer Elektrophorese, FPLC, HPLC (z.B. unter Anwendung von Gelfiltrations-, Reversphasen- oder leicht

hydrophoben Säulen), Gelfiltration, differentieller Präzipitation, Ionenaustausch-Chromatographie und Affinitätschromatographie.

Die Reinigung der erfindungsgemäßen Polypeptide kann die Isolierung von  
5 Membranen ausgehend von Wirtszellen, die die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren  
exprimieren, umfassen. Vorzugsweise exprimieren solche Zellen die erfindungs-  
gemäßen Polypeptide in einer ausreichenden Kopienanzahl, so dass die Menge der  
Polypeptide in einer Membranfraktion mindestens 10-fach höher ist als diejenige, die in  
vergleichen Membranen von Zellen gefunden wird, die Acetylcholinrezeptoren  
10 natürlicherweise exprimieren; besonders bevorzugt ist Menge mindestens 100-fach,  
ganz besonders bevorzugt mindestens 1000-fach höher.

Die Ausdrücke "Isolierung oder Reinigung", wie sie hierin verwendet werden,  
bedeuten, dass die erfindungsgemäßen Polypeptide von anderen Proteinen oder  
15 anderen Makromolekülen der Zelle oder des Gewebes abgetrennt werden. Vorzugs-  
weise ist eine die erfindungsgemäßen Polypeptide enthaltende Zusammensetzung  
hinsichtlich des Proteingehalts gegenüber einer Präparation aus den Wirtszellen  
mindestens 10-fach und besonders bevorzugt mindestens 100-fach angereichert.

20 Die erfindungsgemäßen Polypeptide können auch ohne Fusionspartner mit Hilfe von  
Antikörpern, die an die Polypeptide binden, affinitätsgereinigt werden.

Weiterhin sind Antikörper Gegenstand der Erfindung, die spezifisch an die vorstehend  
genannten Polypeptide bzw. Rezeptoren binden. Die Herstellung solcher Antikörper er-  
25 folgt auf die übliche Weise. Beispielsweise können solche Antikörper produziert  
werden durch die Injektion eines substantiell immunkompetenten Wirts mit einer für  
die Antikörperproduktion effektiven Menge eines erfindungsgemäßen Acetylcholin-  
rezeptor-Polypeptids oder eines Fragments davon und durch nachfolgende Ge-  
winnung dieses Antikörpers. Weiterhin läßt sich in an sich bekannter Weise eine  
30 immortalisierte Zelllinie erhalten, die monoklonale Antikörper produziert. Die  
Antikörper können gegebenenfalls mit einem Nachweisreagenz markiert sein.

Bevorzugte Beispiele für ein solches Nachweis-Reagenz sind Enzyme, radioaktiv markierte Elemente, fluoreszierende Chemikalien oder Biotin. Anstelle des vollständigen Antikörpers können auch Fragmente eingesetzt werden, die die gewünschten spezifischen Bindungseigenschaften besitzen.

5

Die erfindungsgemäße Nukleinsäure kann insbesondere zur Herstellung transgener Invertebraten verwendet werden. Diese können in Testsysteme eingesetzt werden, die auf einer vom Wildtyp abweichenden Expression der erfindungsgemäßen Rezeptoren oder Varianten hiervon basieren. Ferner fallen hierunter sämtliche transgenen Invertebraten, bei denen durch die Modifikation anderer Gene oder Genkontrollsequenzen (Promotoren) eine Veränderung der Expression der erfindungsgemäßen Rezeptoren oder deren Varianten eintritt.

10

Die Herstellung der transgenen Invertebraten erfolgt beispielsweise in *Drosophila melanogaster* durch P-Element-vermittelten Gentransfer (Hay et al. 1997) oder in *Caenorhabditis elegans* durch Transposon-vermittelten Gentransfer (z.B. durch Tc1, Plasterk 1996).

15

Gegenstand der Erfindung sind somit auch transgene Invertebraten, die zumindest eine der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren enthalten, vorzugsweise transgene Invertebraten der Arten *Drosophila melanogaster* oder *Caenorhabditis elegans*, sowie deren transgene Nachkommen. Vorzugsweise enthalten die transgenen Invertebraten die erfindungsgemäßen Rezeptoren in einer vom Wildtyp abweichenden Form.

20

Die erfindungsgemäße Nukleinsäure kann auf die übliche Weise hergestellt werden. Beispielsweise kann das Nukleinsäuremolekül vollständig chemisch synthetisiert werden. Man kann auch nur kurze Stücke der erfindungsgemäßen Sequenz chemisch synthetisieren und solche Oligonukleotide radioaktiv oder mit einem Fluoreszenzfarbstoff markieren. Die markierten Oligonukleotide können verwendet werden, um ausgehend von Insekten-mRNA hergestellte cDNA-Banken zu durchsuchen. Klone, an die die markierten Oligonukleotide hybridisieren, werden zur Isolierung der be-

25

30

treffenden DNA ausgewählt. Nach der Charakterisierung der isolierten DNA erhält man auf einfache Weise die erfindungsgemäße Nukleinsäure.

5 Die erfindungsgemäße Nukleinsäure kann auch mittels PCR-Verfahren unter Verwendung chemisch synthetisierter Oligonukleotide hergestellt werden.

Der Ausdruck "Oligonukleotid(e)", wie er hierin verwendet wird, bedeutet DNA-Moleküle, die aus 10 bis 50 Nukleotiden, vorzugsweise 15 bis 30 Nukleotiden, bestehen. Sie werden chemisch synthetisiert und können als Sonden verwendet werden.

10

Die erfindungsgemäße Nukleinsäure kann zur Isolierung und Charakterisierung der regulatorischen Regionen, die natürlicherweise benachbart zu der kodierenden Region vorkommen, verwendet werden. Solche regulatorischen Regionen sind somit ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

15

Mit Hilfe der erfindungsgemäße Nukleinsäure können neue Wirkstoffe für den Pflanzenschutz bzw. pharmazeutische Wirkstoffe für die Behandlung von Mensch und/oder Tier, wie Verbindungen, welche als Modulatoren, insbesondere als Agonisten oder Antagonisten, die Leitungseigenschaften der erfindungsgemäßen Acetylcholinrezeptoren verändern, identifiziert werden. Dazu wird ein rekombinantes DNA-Molekül, das die erfindungsgemäße Nukleinsäure umfaßt, in eine geeignete Wirtszelle eingebracht. Die Wirtszelle wird in Gegenwart einer Verbindung oder einer Probe, welche eine Vielzahl von Verbindungen umfaßt, unter Bedingungen kultiviert, die die Expression der erfindungsgemäßen Rezeptoren erlauben. Eine Veränderung der Rezeptoreigenschaften kann - wie nachstehend in Beispiel 2 beschrieben - detektiert werden. Auf diese Weise ist es möglich, insektizide Substanzen aufzufinden.

20

25

Die erfindungsgemäße Nukleinsäure ermöglicht auch das Auffinden von Verbindungen, die an die erfindungsgemäßen Rezeptoren binden. Diese können ebenfalls als Insektizide angewandt werden. Beispielsweise werden Wirtszellen, die die erfindungsgemäße Nukleinsäure enthalten und die entsprechenden Rezeptoren bzw. Polypeptide

30

exprimieren oder die Genprodukte selbst mit einer Verbindung oder einem Gemisch von Verbindungen unter Bedingungen in Kontakt gebracht, die die Wechselwirkung zumindest einer Verbindung mit den Wirtszellen, den Rezeptoren oder den einzelnen Polypeptiden erlauben.

5

Unter Verwendung von Wirtszellen oder transgenen Invertebraten, die die erfindungsgemäße Nukleinsäure enthalten, ist es auch möglich, Substanzen aufzufinden, welche die Expression der Rezeptoren verändern.

10

Die vorstehend beschriebenen erfindungsgemäße Nukleinsäure, Vektoren und regulatorischen Regionen können außerdem zum Auffinden von Genen verwendet werden, die für Polypeptide kodieren, welche am Aufbau von funktionell ähnlichen Acetylcholinrezeptoren in Insekten beteiligt sind. Unter funktionell ähnlichen Rezeptoren werden gemäß der vorliegenden Erfindung Rezeptoren verstanden, die Polypeptide umfassen, welche sich zwar hinsichtlich der Aminosäuresequenz von den hierin beschriebenen Polypeptiden unterscheiden, aber im wesentlichen dieselben Funktionen haben.

15

**Erläuterungen zum Sequenzprotokoll und zu der Abbildung:**

5 SEQ ID NO: 1 zeigt die Nukleotidsequenz der isolierten Db3-cDNA, beginnend mit Position 1 und endend mit Position 1539. SEQ ID NO: 1 und SEQ ID NO: 2 zeigen ferner die Aminosäuresequenzen des von der Db3-cDNA-Sequenz abgeleiteten Proteins.

SEQ ID NO: 3 und SEQ ID NO: 4 zeigen die im Beispiel 1 beschriebenen Oligodesoxynukleotide.

10

Abb. 1 zeigt die Acetylcholin-induzierten Ströme, die von Xenopus-Oocyten mit Hilfe von Ganz-Zell-Ableitungen gemessen wurden, aufgetragen gegen die Zeit. Ströme werden in nano-Ampere, Zeit in Sekunden dargestellt. Die Oocyten waren mit cDNA-Expressionsplasmiden injiziert, die für die  $\alpha 1$ -,  $\alpha 2$ - und  $\beta 3$ -Untereinheit von Drosophila kodierten. Die Zeitpunkte der Acetylcholin-Applikationen sind mit Querbalken gekennzeichnet.

15



**Beispiele:****Beispiel 1**

## 5      Isolierung der beschriebenen Polynukleotidsequenz

## Allgemeines

10      Die Manipulation von Polynukleotiden erfolgte nach Standardmethoden der rekombinanten DNA Technologie (Sambrook, et al., 1989). Die bioinformatische Bearbeitung von Nukleotid- und Proteinsequenzen erfolgten mit dem Programmpaket GCG Version 10.0 (GCG Genetics Computer Group, Inc., Madison Wisconsin, USA).

## Isolierung partieller Polynukleotidsequenzen mittels PCR

15      Aus einer Datenbankrecherche mit der Proteinsequenz der ARD Untereinheit von *Drosophila melanogaster* gegen die genomische *Drosophila melanogaster* Datenbank wurden ein Nukleinsäurebereich identifiziert, der eine Identität auf Aminosäureebene zu ARD von 28% besitzt. Anhand dieser Partialsequenz wurden Oligodesoxynukleotidprimer (dg1sense: 5'-TGGCARCCITCICARTAYGA-3',  
20      dg2anti: 5'-CATRATYTTYTCICCCICCCAT-3') abgeleitet. RNA wurde mittels Trizol-Reagenz (Gibco BRL) aus *Drosophila melanogaster*-Embryonen nach Angaben des Herstellers isoliert. 10 µg dieser RNA wurden in eine cDNA-Erststrangsynthese (Superscript Präamplifizierungssystem für die cDNA-Erststrangsynthese, Gibco BRL, nach Angaben des Herstellers, 45°C  
25      Reaktionstemperatur) eingesetzt. Anschließend wurden jeweils 1/100 der o.g. Erststrang-cDNA in eine Polymerasekettenreaktion (PCR) mit den Oligonukleotiden dg1sense und dg2anti eingesetzt (Taq DNA Polymerase, rekombinant, Gibco BRL). Die PCR-Parameter waren wie folgt: 94°C, 1 min; 35 mal (94°C, 30 s; 55°C, 30 s; 72°C, 45 s) Hieraus ergab sich eine im Agarosegel (1 %) erkennbare Bande von ca.  
30      0,6 kb. Diese wurde mittels des pCR TOPO Kits subkloniert (Invitrogen).

## Isolierung von poly-A-enthaltender RNA aus Drosophila melanogaster-Gewebe und Konstruktion der cDNA-Bibliotheken

Die RNA für die cDNA-Bibliothek wurde aus Drosophila melanogaster Embryonen und Larven mit Trizol (Gibco BRL) nach Angaben des Herstellers isoliert. Aus dieser RNA wurden nun die poly-A-enthaltenden RNAs durch Reinigung über Dyna Beads 280 (Dyna) isoliert. 5 µg dieser poly A enthaltenden RNAs wurden anschließend in die Konstruktion der cDNA-Bibliothek mit dem λ-ZAP-CMV Vektor eingesetzt (cDNA Synthesis Kit, ZAP-cDNA Synthesis Kit und ZAP-cDNA Gigapack III Gold Cloning Kit, alle Stratagene).

## Isolierung der vollständige Polynukleotidsequenzen aus der cDNA-Bibliothek

Der Screen mit  $10^6$  plaque forming units wurde mit Hilfe des DIG Systems durchgeführt (alle Reagenzien und Verbrauchsmaterialien Boehringer Mannheim, nach Angaben im „The DIG System User's Guide for Filter Hybridization“, Boehringer Mannheim). Die eingesetzte DNA-Sonde wurden durch PCR mittels Digoxigenin markiertem dUTP präpariert, Die Hybridisierungen erfolgten in DIG Easy Hyb (Boehringer Mannheim) bei 42°C über Nacht. Der Nachweis markierter DNA auf Nylonmembranen geschah durch Chemolumineszenz (CDP-Star, Boehringer Mannheim) unter Verwendung von Röntgenfilmen (Hyperfilm MP, Amersham). Vereinzelte und in der Hybridisierung positive Plaques wurden mittels in vivo Exzision in Plasmide (pCMV) überführt (Stratagene, ZAP-cDNA Synthesis Kit). Die isolierten Plasmide wurden zur Identifikation mittels T3 und T7 Primer ansequenziert (ABI Prism Dye Terminator Cycle Sequencing Kit, ABI, mit ABI Prism 310 Genetic Analyzer). Die Bestimmung der vollständigen Polynukleotidsequenzen des DB3 erfolgte durch Primer Walking mittels Cycle Sequencing ABI Prism Dye Terminator Cycle Sequencing Kit, ABI, mit ABI Prism 310 Genetic Analyzer.

**Beispiel 2**

Expression von rekombinanten Insekten-Acetylcholinrezeptoren enthaltend die neue  $\beta 3$ -Untereinheit von Drosophila in Xenopus-Oocyten

5

10

15

Oocyten wurden gleichzeitig mit cDNA-Expressionsplasmiden injiziert, die für die  $\alpha 1$ -,  $\alpha 2$ - und  $\beta 3$ -Untereinheit von Drosophila kodierten. Die  $\alpha$ -Untereinheiten waren in pcDNA3 kloniert, die  $\beta$ -Untereinheit in pCMV wie oben beschrieben. Nach drei bis fünf Tagen Inkubation wurden die Ströme durch die Zellmembran der Oocyten mit Ganz-Zell-Ableitungen gemessen wie beschrieben (Cooper et al. 1996). Dazu wurde die Potentialdifferenz über die Zellmembran bei -80mV konstant gehalten und die Zellen mit Acetylcholin (10 $\mu$ M) stimuliert. Unmittelbar nach dem Stimulus konnten starke Einwärtsströme gemessen werden, die typisch für die Aktivierung von Ionenkanälen waren (Abb. 1). Dies zeigt, dass die neue  $\beta 3$ -Untereinheit von Drosophila funktionale Rezeptoren mit einer der beiden koinjizierten  $\alpha$ -Untereinheiten bildet, oder mit beiden.

Literatur:

5 Amar et al. (1995), A nicotinic acetylcholine receptor subunit from insect brain forms a non-desensitizing homo-oligomeric nicotinic acetylcholine receptor when expressed in *Xenopus* oocytes, *Neuroscience Letters* 199, 107-110

Bargmann und Kaplan (1998), Signal transduction in the *Caenorhabditis elegans* nervous system, *Ann. Rev. Neurosci.*, 21, 279-308

10 Bossy et al. (1988), Conservation of neural nicotinic acetylcholine receptors from *Drosophila* to vertebrate central nervous systems, *EMBO J.* 7, 611-618

Breer et al. (1987), Molecular properties and functions of insect acetylcholine receptors, *J. Insect Physiol.* 33, 771-790

15 Buckingham et al. (1997), Imidacloprid actions on insect neuronal acetylcholine receptors, *J. Exp. Biol.* 200, 2685-2692

20 Changeux et al. (1992), The functional architecture of the nicotinic acetylcholine receptor explored by affinity labelling and site-directed mutagenesis, *Quarterly Review of Biophysics* 25, 395-432

25 Claudio et al. (1983), Nucleotide and deduced amino acid sequences of *Torpedo californica* acetylcholine receptor  $\gamma$  subunit, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 1111-1115

Cooper et al. (1996), *Eur. J. Pharmacol.* 309, 287

30 Devereux et al. (1984), *Nucleic Acids Research* 12, 387

Devillers-Thiery et al. (1983), Complete mRNA coding sequence of the acetylcholine binding  $\alpha$ -subunit of *Torpedo marmorata* acetylcholine receptor: a model for the transmembrane organization of the polypeptide chain, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 2067-2071

5

Elgoyhen et al. (1997), US Pat. No. 5,683,912

Eastham et al. (1998), Characterisation of a nicotinic acetylcholine receptor from the insect *Manduca sexta*, Eur. J. Neurosci 10, 879-889

10

Hay et al. (1997), P element insertion-dependent gene activation in the *Drosophila* eye, Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America 94 (10), 5195-5200

15

Hermans-Borgmeyer et al. (1986), Primary structure of a developmentally regulated nicotinic acetylcholine receptor protein from *Drosophila*, EMBO J. 5, 1503-1508

Hermesen et al. (1998), Neuronal nicotinic receptors in the locust *Locusta migratoria*. Cloning and expression, J Biol Chem. 17, 18394-404.

20

Heinemann et al. (1997), US Pat. No 5,591,590

Huang et al. (1999), Molecular characterization and imidacloprid selectivity of nicotinic acetylcholine receptor subunits from the peach-potato aphid *myzus persica*,  
25 Neurochem., 73, 380-389

Lindstrom et al. (1997), US Pat. No. 5,599,709

30

Marshall et al. (1990), Sequence and functional expression of a single  $\alpha$  subunit of an insect nicotinic acetylcholine receptor, EMBO J. 9, 4391-4398

Matsuda et al. (1998), Effects of the  $\alpha$  subunit on imidacloprid sensitivity of recombinant nicotinic acetylcholine receptors, Br. J. Pharmacol. 123, 518-524

5 Noda et al. (1982), Primary structure of  $\alpha$ -subunit precursor of *Torpedo californica* acetylcholine receptor deduced from cDNA sequence, Nature 299, 793-797

Noda et al. (1983a), Primary structures of  $\beta$ - and  $\delta$ -subunit precursor of *Torpedo californica* acetylcholine receptor deduced from cDNA sequences, Nature 301, 251-255

10

Noda et al. (1983b), Structural homology of *Torpedo californica* acetylcholine receptor subunits, Nature 302, 528-532

15 Ortells et al. (1995), Evolutionary history of the ligand-gated ion-channel superfamily of receptors, Trends in Neurosciences 18, 121-127

Plasterk (1996), The Tc1/mariner transposon family, Transposable Elements/Current Topics in Microbiology and Immunology 204, 125-143

20

Sambrook et al. (1989), Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Harbour Press

Sawruk et al. (1990a), Heterogeneity of *Drosophila* nicotinic acetylcholine receptors: SAD, a novel developmentally regulated  $\alpha$ -subunit, EMBO J. 9, 2671-2677

25

Sawruk et al. (1990b), SBD, a novel structural subunit of the *Drosophila* nicotinic acetylcholine receptor, shares its genomic localization with two  $\alpha$ -subunits, FEBS Lett. 273, 177-181

Schloß et al. (1988), Neuronal acetylcholine receptors of *Drosophila*: the ARD protein is a component of a high-affinity  $\alpha$ -bungarotoxin binding complex, EMBO J 7, 2889-2984

- 5 Schoepfer et al. (1990), Brain alpha-bungarotoxin binding protein cDNAs and MAbs reveal subtypes of this branch of the ligand-gated ion channel gene superfamily, Neuron 5, 35-48.

- 10 Schulz et al. (1998), D $\alpha$ 3, a new functional  $\alpha$ -subunit of nicotinic acetylcholine receptors from *Drosophila*, J. Neurochem. 71, 853-862

- Sgard et al. (1998), Cloning and Functional Characterization of Two Novel Nicotinic Acetylcholine Receptor  $\alpha$  subunits from the Insect Pest *Myzus persicae*; J. Neurochem 71, 903-912

15

**Patentansprüche**

1. Nukleinsäure umfassend eine Sequenz ausgewählt aus
  - 5 (a) der Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1,
  - (b) zumindest 14 Basenpaare langen Teilsequenzen der unter (a) definierten Sequenz,
  - 10 (c) Sequenzen, welche an die unter (a) definierte Sequenz hybridisieren,
  - (d) Sequenzen, welche eine zumindest 70 %ige Identität mit der Sequenz zwischen Position 43 und Position 1368 der unter (a) definierten Sequenz aufweisen,
  - 15 (e) Sequenzen, welche zu der unter (a) definierten Sequenz komplementär sind und
  - (f) Sequenzen, welche aufgrund der Degeneriertheit des genetischen Codes für dieselbe Aminosäuresequenz kodieren wie die unter (a) bis  
20 (d) definierten Sequenzen.
2. Vektor umfassend zumindest eine Nukleinsäure gemäß Anspruch 1.
- 25 3. Vektor nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass das Nukleinsäuremolekül funktionell mit regulatorischen Sequenzen verknüpft ist, die die Expression der Nukleinsäure in pro- oder eukaryotischen Zellen gewährleisten.
4. Wirtszelle enthaltend eine Nukleinsäure gemäß Anspruch 1 oder einen Vektor  
30 gemäß Anspruch 2 oder 3.



5. Wirtszelle nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um eine pro- oder eukaryotische Zelle handelt.
- 5 6. Wirtszelle nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass die prokaryotische Zelle E.coli ist.
7. Wirtszelle nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass die eukaryotische Zelle eine Säuger- oder Insektenzelle ist.
- 10 8. Polypeptid, welches von einer Nukleinsäure gemäß Anspruch 1 kodiert wird.
9. Polypeptid, welches die biologische Funktion einer Acetylcholinrezeptor- $\beta$ -Untereinheit ausübt und eine Aminosäuresequenz umfasst, die eine zumindest 40%ige Identität mit der Sequenz gemäß SEQ ID NO: 2 aufweist.
- 15 10. Acetylcholinrezeptor umfassend zumindest ein Polypeptid gemäß Anspruch 8 oder 9.
- 20 11. Verfahren zum Herstellen eines Polypeptids gemäß Anspruch 8 oder 9 umfassend
- (a) das Kultivieren einer Wirtszelle gemäß einem der Ansprüche 4 bis 7 unter Bedingungen, die die Expression der Nukleinsäure gemäß Anspruch 1 gewährleisten, und
- 25 (b) die Gewinnung des Polypeptids aus der Zelle oder dem Kulturmedium.
- 30 12. Antikörper, welcher spezifisch mit dem Polypeptid gemäß Anspruch 8 oder 9, oder mit dem Rezeptor gemäß Anspruch 10 reagiert.

13. Transgener Invertebrat enthaltend eine Nukleinsäure gemäß Anspruch 1.
14. Transgener Invertebrat nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um *Drosophila melanogaster* oder *Caenorhabditis elegans* handelt.
- 5 15. Verfahren zum Herstellen eines transgenen Invertebraten gemäß Anspruch 13 oder 14 umfassend das Einbringen einer Nukleinsäure gemäß Anspruch 1 oder eines Vektors gemäß Anspruch 2 oder 3.
- 10 16. Transgene Nachkommen eines Invertebraten gemäß Anspruch 13 oder 14.
17. Verfahren zum Herstellen einer Nukleinsäure gemäß Anspruch 1 umfassend die folgenden Schritte:
- 15 (a) Vollständige chemische Synthese auf an sich bekannte Weise oder
- (b) chemische Synthese von Oligonukleotiden, Markieren der Oligonukleotide, Hybridisieren der Oligonukleotide an DNA einer Insekten-cDNA-Bank, Selektieren von positiven Klonen und Isolieren der
- 20 hybridisierenden DNA aus positiven Klonen oder
- (c) chemische Synthese von Oligonukleotiden und Amplifizierung der Ziel-DNA mittels PCR.
- 25 18. Regulatorische Region, welche natürlicherweise die Transkription einer Nukleinsäure gemäß Anspruch 1 in Insektenzellen kontrolliert und eine spezifische Expression gewährleistet.
- 30 19. Verfahren zum Auffinden neuer Wirkstoffe für den Pflanzenschutz oder von pharmazeutischen Wirkstoffen für die Behandlung von Mensch oder Tier,

insbesondere von Verbindungen, welche die Leitungseigenschaften von Rezeptoren gemäß Anspruch 10 verändern, umfassend die folgenden Schritte:

5

- (a) Bereitstellen einer Wirtszelle gemäß einem der Ansprüche 4 bis 7,
- (b) Kultivieren der Wirtszelle in der Gegenwart einer Verbindung oder eines Gemisches von Verbindungen, und
- (c) Detektieren veränderter Leitungseigenschaften.

10

20. Verfahren zum Auffinden einer Verbindung, die an Rezeptoren gemäß Anspruch 10 binden, umfassend die folgenden Schritte:

15

- (a) Inkontaktbringen einer Wirtszelle gemäß einem der Ansprüche 4 bis 7, eines Polypeptids gemäß Anspruch 8 oder 9, oder eines Rezeptors gemäß Anspruch 10 mit einer Verbindung oder einem Gemisch von Verbindungen unter Bedingungen, die die Interaktion zumindest einer Verbindung mit der Wirtszelle, dem Polypeptid oder dem Rezeptor erlauben, und

20

- (b) Bestimmen der Verbindung(en), die spezifisch an die Rezeptoren binden.

25

21. Verfahren zum Auffinden von Verbindungen, die die Expression von Rezeptoren gemäß Anspruch 10 verändern, umfassend die folgenden Schritte:

30

- (a) Inkontaktbringen einer Wirtszelle gemäß einem der Ansprüche 4 bis 7 oder eines transgenen Invertebraten gemäß Anspruch 13 oder 14 mit einer Verbindung oder einem Gemisch von Verbindungen,
- (b) Bestimmen der Rezeptorkonzentration, und

(c) Bestimmen der Verbindung(en), die die Expression des Rezeptors spezifisch beeinflussen.

- 5      22. Verwendung einer Nukleinsäure gemäß Anspruch 1, eines Vektors gemäß Anspruch 2 oder 3, einer Wirtszelle gemäß einem der Ansprüche 4 bis 7, eines Polypeptids gemäß Anspruch 8 oder 9, eines Acetylcholinrezeptors gemäß Anspruch 10, eines Antikörpers gemäß Anspruch 12, eines transgenen Invertebraten gemäß Anspruch 13 oder 14 oder einer regulatorischen Region gemäß Anspruch 18 zum Auffinden neuer Wirkstoffe für den Pflanzenschutz oder von pharmazeutischen Wirkstoffen für die Behandlung von Mensch oder Tier.

Nukleinsäuren, die für neue Acetylcholinrezeptor- $\beta$ -Untereinheiten von Insekten kodieren

Z u s a m m e n f a s s u n g

Die Erfindung betrifft Nukleinsäuren, die für Acetylcholinrezeptor- $\beta$ -Untereinheiten von Insekten kodieren, sowie Polypeptide, welche die biologische Funktion solcher Acetylcholinrezeptor- $\beta$ -Untereinheiten ausüben, und insbesondere deren Verwendung zum Auffinden von Wirkstoffen für den Pflanzenschutz.

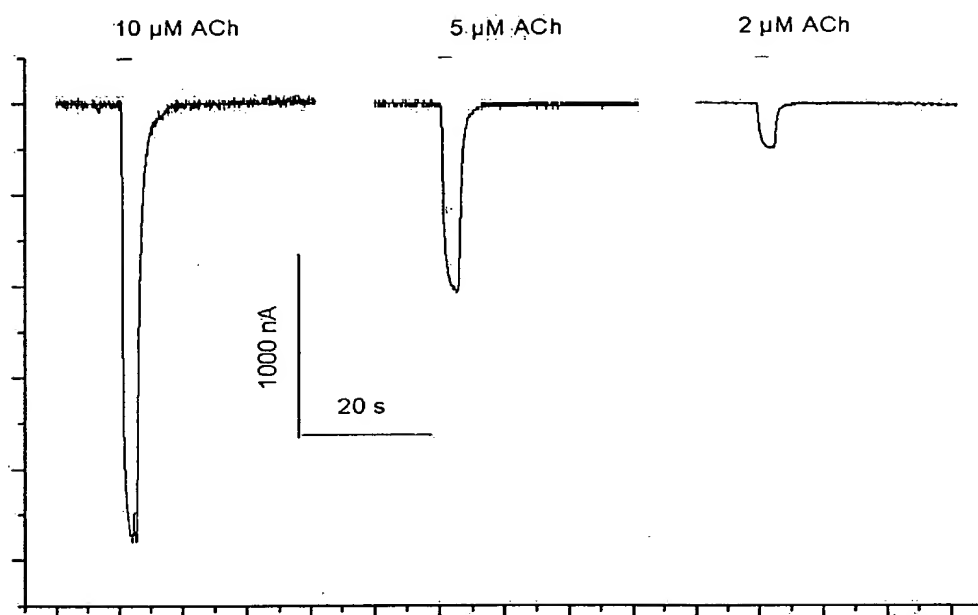


Abb. 1

# SEQUENZPROTOKOLL

<110> Bayer Aktiengesellschaft

<120> Nukleinsäuren, die für neue  
Acetylcholinrezeptor-beta-Untereinheiten von Insekten  
kodieren

<130> Le A 34 147

<140>

<141>

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1539

<212> DNA

<213> Drosophila melanogaster

<220>

<221> CDS

<222> (43)..(1365)

<400> 1

attcggcagc aggggtacatc cgaaacaaag gcgcgctgaa ca atg acg acg act 54  
Met Thr Thr Thr

1

ccc aag ata aag gca cca gtt tcc ggt cct gga ctg cca cta ctg ctg 102  
Pro Lys Ile Lys Ala Pro Val Ser Gly Pro Gly Leu Pro Leu Leu Leu  
5 10 15 20

caa atg cta atg ggg atg ctt ctt atg ggg ctg act tcc gtg cca ggc 150  
Gln Met Leu Met Gly Met Leu Leu Met Gly Leu Thr Ser Val Pro Gly  
25 30 35

gcc act gcc acc gcg gac ccc aag aac gcc aat gtc aag gcc ctg gat 198  
Ala Thr Ala Thr Ala Asp Pro Lys Asn Ala Asn Val Lys Ala Leu Asp  
40 45 50

cgc ctc cac gcc ggc ctg ttc acg aac tac gac agc gat gtg cag ccg 246  
Arg Leu His Ala Gly Leu Phe Thr Asn Tyr Asp Ser Asp Val Gln Pro  
55 60 65

gtg ttc caa gga acc ccc acg aac gtg tcc ctg gaa atg gtg gtc acc 294

Val	Phe	Gln	Gly	Thr	Pro	Thr	Asn	Val	Ser	Leu	Glu	Met	Val	Val	Thr	
70						75					80					
tac	ata	gac	atc	gac	gag	ttg	aac	ggc	aag	ctg	acc	acc	cac	tgc	tgg	342
Tyr	Ile	Asp	Ile	Asp	Glu	Leu	Asn	Gly	Lys	Leu	Thr	Thr	His	Cys	Trp	
85					90				95					100		
ctg	aat	ctc	cga	tgg	aga	gac	gag	gag	cgc	gtg	tgg	caa	ccg	tca	caa	390
Leu	Asn	Leu	Arg	Trp	Arg	Asp	Glu	Glu	Arg	Val	Trp	Gln	Pro	Ser	Gln	
			105						110					115		
tat	gac	aac	atc	acg	cag	atc	act	ttg	aag	tcc	agc	gag	gtc	tgg	acc	438
Tyr	Asp	Asn	Ile	Thr	Gln	Ile	Thr	Leu	Lys	Ser	Ser	Glu	Val	Trp	Thr	
			120					125						130		
ccc	caa	atc	aca	ctc	ttc	aac	ggc	gac	gaa	ggg	ggc	ctg	atg	gcc	gaa	486
Phe	Gln	Ile	Thr	Leu	Phe	Asn	Gly	Asp	Glu	Gly	Gly	Leu	Met	Ala	Glu	
			135				140							145		
acc	cag	gtg	acc	ctc	agc	cac	gat	ggc	cac	ttc	cgg	tgg	atg	cct	cca	534
Thr	Gln	Val	Thr	Leu	Ser	His	Asp	Gly	His	Phe	Arg	Trp	Met	Pro	Pro	
			150				155					160				
gcc	gtg	tac	acg	gcc	tac	tgc	gaa	ctc	aac	atg	ctc	aac	tgg	ccc	cac	582
Ala	Val	Tyr	Thr	Ala	Tyr	Cys	Glu	Leu	Asn	Met	Leu	Asn	Trp	Pro	His	
165					170					175				180		
gac	aag	cag	agc	tgc	aag	ttg	aag	atc	ggc	tcc	tgg	ggc	ctg	aag	gtc	630
Asp	Lys	Gln	Ser	Cys	Lys	Leu	Lys	Ile	Gly	Ser	Trp	Gly	Leu	Lys	Val	
				185					190					195		
gtc	ctg	ccg	gag	aac	ggc	acg	gcg	aga	gga	gag	tcc	ctt	gac	cac	gac	678
Val	Leu	Pro	Glu	Asn	Gly	Thr	Ala	Arg	Gly	Glu	Ser	Leu	Asp	His	Asp	
			200					205						210		
gac	ctg	gtt	cag	tca	ccg	gag	tgg	gaa	atc	gtg	gac	tcg	cga	gcc	cac	726
Asp	Leu	Val	Gln	Ser	Pro	Glu	Trp	Glu	Ile	Val	Asp	Ser	Arg	Ala	His	
			215					220						225		
ttt	gtc	agt	cag	gac	tac	tac	ggc	tac	atg	gag	tac	act	ctg	acg	gct	774
Phe	Val	Ser	Gln	Asp	Tyr	Tyr	Gly	Tyr	Met	Glu	Tyr	Thr	Leu	Thr	Ala	
			230				235							240		
cag	cgg	cgc	tcc	tcc	atg	tac	acg	gcc	gtc	atc	tac	aca	ccc	gcg	tcc	822
Gln	Arg	Arg	Ser	Ser	Met	Tyr	Thr	Ala	Val	Ile	Tyr	Thr	Pro	Ala	Ser	
245					250					255				260		
tgc	atc	gtc	atc	ctg	gcc	ctc	tca	gcc	ttc	tgg	ctg	cct	ccc	cac	atg	870



Cys	Ile	Val	Ile	Leu	Ala	Leu	Ser	Ala	Phe	Trp	Leu	Pro	Pro	His	Met	
				265					270					275		
ggc	ggc	gag	aag	atc	atg	atc	aac	ggc	ctg	ctc	atc	atc	gtg	atc	gcc	918
Gly	Gly	Glu	Lys	Ile	Met	Ile	Asn	Gly	Leu	Leu	Ile	Ile	Val	Ile	Ala	
			280					285					290			
gcc	ttc	ctc	atg	tac	ttc	gcc	cag	ctc	ctg	cca	gtg	ctg	tcc	aac	aat	966
Ala	Phe	Leu	Met	Tyr	Phe	Ala	Gln	Leu	Leu	Pro	Val	Leu	Ser	Asn	Asn	
			295					300					305			
act	cca	ctt	gtg	gta	atc	ttc	tac	agc	acc	agc	ctg	ctg	tat	ctg	agc	1014
Thr	Pro	Leu	Val	Val	Ile	Phe	Tyr	Ser	Thr	Ser	Leu	Leu	Tyr	Leu	Ser	
			310					315					320			
gtc	tcc	acc	atc	gtc	gag	gtt	cta	gtt	ctg	tac	ctg	gcc	aca	ggc	aag	1062
Val	Ser	Thr	Ile	Val	Glu	Val	Leu	Val	Leu	Tyr	Leu	Ala	Thr	Gly	Lys	
			325				330				335				340	
cac	aag	agg	cgc	ctg	ccg	gag	gcg	ctg	aga	aag	ctg	ctg	cac	ggg	cac	1110
His	Lys	Arg	Arg	Leu	Pro	Glu	Ala	Leu	Arg	Lys	Leu	Leu	His	Gly	His	
							345				350				355	
ctg	ggc	acg	tgg	ctg	ctg	ctc	tcg	gtg	ttc	agc	acc	act	ggc	gag	tcg	1158
Leu	Gly	Thr	Trp	Leu	Leu	Leu	Ser	Val	Phe	Ser	Thr	Thr	Gly	Glu	Ser	
							360						370			
cag	gcg	gag	aag	acc	aaa	gag	atg	gac	gag	cac	ccg	tac	gag	gag	gcg	1206
Gln	Ala	Glu	Lys	Thr	Lys	Glu	Met	Asp	Glu	His	Pro	Tyr	Glu	Glu	Ala	
							375				380				385	
gac	gag	cag	gag	tcc	agt	ccg	ctg	ggc	atc	aac	cac	acc	gag	gtg	ccg	1254
Asp	Glu	Gln	Glu	Ser	Ser	Pro	Leu	Gly	Ile	Asn	His	Thr	Glu	Val	Pro	
							390						400			
ggc	gcc	aag	gcc	aac	cag	ttc	gac	tgg	gcg	ctg	ctg	gcc	acc	gcc	gtg	1302
Gly	Ala	Lys	Ala	Asn	Gln	Phe	Asp	Trp	Ala	Leu	Leu	Ala	Thr	Ala	Val	
							405				415				420	
gac	cgc	att	tcc	ttc	gtt	tcc	ttc	agc	ctg	gcc	ttc	ctc	att	ctg	gcc	1350
Asp	Arg	Ile	Ser	Phe	Val	Ser	Phe	Ser	Leu	Ala	Phe	Leu	Ile	Leu	Ala	
							425				430				435	
atc	agg	tgc	tcc	gtg	tagggatgct	cgagactcaa	ggccacatcc	caagccagtg								1405
Ile	Arg	Cys	Ser	Val												
							440									
cgcaactctga	actagttttg	catttgcgat	ttcatgtatt	taatgtgtgt	gcgaacttat											1465

aattatttaa tgatgagacc tcgtatggaa taaaggacct ctgccgaatg tctgcttaca 1525

aaaaaaaaaa aaaa

1539

<210> 2

<211> 441

<212> PRT

<213> Drosophila melanogaster

<400> 2

Met Thr Thr Thr Pro Lys Ile Lys Ala Pro Val Ser Gly Pro Gly Leu  
1 5 10 15

Pro Leu Leu Leu Gln Met Leu Met Gly Met Leu Leu Met Gly Leu Thr  
20 25 30

Ser Val Pro Gly Ala Thr Ala Thr Ala Asp Pro Lys Asn Ala Asn Val  
35 40 45

Lys Ala Leu Asp Arg Leu His Ala Gly Leu Phe Thr Asn Tyr Asp Ser  
50 55 60

Asp Val Gln Pro Val Phe Gln Gly Thr Pro Thr Asn Val Ser Leu Glu  
65 70 75 80

Met Val Val Thr Tyr Ile Asp Ile Asp Glu Leu Asn Gly Lys Leu Thr  
85 90 95

Thr His Cys Trp Leu Asn Leu Arg Trp Arg Asp Glu Glu Arg Val Trp  
100 105 110

Gln Pro Ser Gln Tyr Asp Asn Ile Thr Gln Ile Thr Leu Lys Ser Ser  
115 120 125

Glu Val Trp Thr Pro Gln Ile Thr Leu Phe Asn Gly Asp Glu Gly Gly  
130 135 140

Leu Met Ala Glu Thr Gln Val Thr Leu Ser His Asp Gly His Phe Arg  
145 150 155 160

Trp Met Pro Pro Ala Val Tyr Thr Ala Tyr Cys Glu Leu Asn Met Leu  
165 170 175

Asn Trp Pro His Asp Lys Gln Ser Cys Lys Leu Lys Ile Gly Ser Trp  
180 185 190

Gly Leu Lys Val Val Leu Pro Glu Asn Gly Thr Ala Arg Gly Glu Ser  
195 200 205

Leu Asp His Asp Asp Leu Val Gln Ser Pro Glu Trp Glu Ile Val Asp  
210 215 220

Ser Arg Ala His Phe Val Ser Gln Asp Tyr Tyr Gly Tyr Met Glu Tyr  
225 230 235 240

Thr Leu Thr Ala Gln Arg Arg Ser Ser Met Tyr Thr Ala Val Ile Tyr  
245 250 255

Thr Pro Ala Ser Cys Ile Val Ile Leu Ala Leu Ser Ala Phe Trp Leu  
260 265 270

Pro Pro His Met Gly Gly Glu Lys Ile Met Ile Asn Gly Leu Leu Ile  
275 280 285

Ile Val Ile Ala Ala Phe Leu Met Tyr Phe Ala Gln Leu Leu Pro Val  
290 295 300

Leu Ser Asn Asn Thr Pro Leu Val Val Ile Phe Tyr Ser Thr Ser Leu  
305 310 315 320

Leu Tyr Leu Ser Val Ser Thr Ile Val Glu Val Leu Val Leu Tyr Leu  
325 330 335

Ala Thr Gly Lys His Lys Arg Arg Leu Pro Glu Ala Leu Arg Lys Leu  
340 345 350

Leu His Gly His Leu Gly Thr Trp Leu Leu Leu Ser Val Phe Ser Thr  
355 360 365

Thr Gly Glu Ser Gln Ala Glu Lys Thr Lys Glu Met Asp Glu His Pro  
370 375 380

Tyr Glu Glu Ala Asp Glu Gln Glu Ser Ser Pro Leu Gly Ile Asn His  
385 390 395 400

Thr Glu Val Pro Gly Ala Lys Ala Asn Gln Phe Asp Trp Ala Leu Leu  
405 410 415

Ala Thr Ala Val Asp Arg Ile Ser Phe Val Ser Phe Ser Leu Ala Phe  
420 425 430

Leu Ile Leu Ala Ile Arg Cys Ser Val  
435 440

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:primer

<400> 3

tggarccnt cncartayga

20

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:primer

<400> 4

catratytty tcncnccca t

21